

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LUANNA MUNHOZ ZABAGLIA

MARIANE AVANTE FERRAZ

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES TNF-ALPHA
E E-CADERINA EM AMOSTRAS DE PACIENTES
COM SINTOMAS PÉPTICOS E CÂNCER GÁSTRICO:
UMA POSSÍVEL RELAÇÃO COM O *HELICOBACTER
PYLORI***

**BAURU
2014**

**LUANNA MUNHOZ ZABAGLIA
MARIANE AVANTE FERRAZ**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES TNF-ALPHA
E E-CADERINA EM AMOSTRAS DE PACIENTES
COM SINTOMAS PÉPTICOS E CÂNCER GÁSTRICO:
UMA POSSÍVEL RELAÇÃO COM O *HELICOBACTER
PYLORI***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Biomedicina, sob Orientação do Prof. Dr.
Lucas Trevizani Rasmussen.

BAURU
2014

Z12a	<p data-bbox="521 1293 841 1325">Zabaglia, Luanna Munhoz.</p> <p data-bbox="521 1354 1284 1503">Análise da expressão dos genes TNF-alpha e E-caderina em amostras de pacientes com sintomas pépticos e câncer gástrico: uma possível relação com o <i>Helicobacter Pylori</i> / Luanna Munhoz Zabaglia; Mariane Avante Ferraz. -- 2014. 60f. : il.</p> <p data-bbox="578 1535 1162 1566">Orientador: Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.</p> <p data-bbox="521 1598 1284 1682">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="521 1713 1284 1816">1. <i>Helicobacter pylori</i>. 2. TNF-alpha. 3. E-caderina. 4. Doenças gástricas. 5. Marcadores virulência. I. Ferraz, Mariane Avante. II. Rasmussen, Lucas Trevizani. II. Título.</p>
------	--

LUANNA MUNHOZ ZABAGLIA
MARIANE AVANTE FERRAZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas aplicado como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob Orientação do Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Ms. Agostinho Caleman Neto
Faculdade de Medicina de Marília

Bauru, 02 de Dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho primeiramente, aos nossos pais, pois confiaram em nós e nos deram esta oportunidade de concretizar e encerrar mais uma caminhada das nossas vidas. Sei que eles não mediram esforços pra que este sonho se realizasse, sem a compreensão, ajuda e confiança deles nada disso seria possível hoje. A eles além da dedicatória desta conquista, dedicamos as nossas vidas.

Aos nossos amigos, que nos apoiaram e que sempre estiveram ao nosso lado durante esta longa caminhada.

Ao nosso orientador Lucas, por exigir de nós muito mais do que imaginávamos ser capazes de fazer. Agradecemos por transmitir seus conhecimentos e por fazer de nosso trabalho, uma experiência positiva, por ter confiado em nós, sempre orientando e dedicando parte do seu tempo a nós.

Dedicamos a todos aqueles que fizeram dos nossos sonhos realidade, nos proporcionando forças para que nós não desistíssemos de ir atrás do que buscávamos para nossas vidas. Muitos obstáculos surgiram, mas graças a vocês nós não fraquejamos. Obrigado por tudo família, professores, orientador e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, primeiramente, a Deus por ser o maior mestre que alguém pode conhecer. Por mostrar que somos protegidos, guiados e iluminados pela sua presença divina. Agradecemos Senhor, por nos dar abrigo na tempestade e por criar saídas onde parece não haver escapatória.

Ao nosso orientador, Professor Doutor Lucas Trevizani Rasmussen por sua dedicação e entusiasmo. Por sua grande qualidade humana, sua capacidade acadêmica, pela amizade demonstrada. Também por ser exatamente do jeito que é, ampliando assim, nossas perspectivas, permitindo-nos antever um futuro melhor. Aprendemos muito mais do que estava previsto. Agradecemos pela sua coragem, garra e disposição, por ter se preocupado conosco, instruindo-nos a ir além. Por orientar-nos e ser duro quando fizemos algo errado. É graças a sua visão futura e a sua experiência que conquistamos um currículo de qualidade. Agradecemos também aos nossos pesquisadores colaboradores, em especial, Wilson Aparecido Orcini, por nos auxiliar no desenvolvimento prático do nosso trabalho no laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da Universidade do Sagrado Coração.

Gostaríamos também de agradecer aos nossos pais e familiares. Obrigado por nos darem a vida, oportunidades educacionais e uma carreira, para termos um futuro melhor, por acreditarem em nós, por darem conselhos, seu apoio incondicional e todo o seu amor. Obrigado por se juntarem a nós.

Expressamos imensa gratidão aos nossos amigos e, em especial, a nossa amiga Maria Julia Olivotto, que nos acolheu em seu apartamento nos dias que realizávamos as práticas do nosso trabalho, oferecendo conforto nos dias exaustivos de nossas rotinas.

Agradecemos a Universidade Sagrado Coração - USC e às instituições colaboradoras: Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA e Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

A elaboração deste trabalho de conclusão de curso tornou - se possível graças ao auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo-FAPESP (Nº Processo 2013/21224-4 e 2013/21285-3) na forma de bolsa de estudo, na qual somos profundamente gratas.

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa que coloniza a mucosa do estômago e é responsável por várias doenças gastroduodenais, como: gastrites crônicas, úlceras e neoplasias gástricas. Sabe-se que as doenças gástricas são influenciadas pelo grau de virulência da cepa *H. pylori* infectante, a susceptibilidade genética do hospedeiro e cofatores ambientais, sendo de suma importância o entendimento dos marcadores de patogenicidade do *H. pylori* assim como a susceptibilidade genética do hospedeiro. O presente trabalho teve como objetivos analisar a expressão dos genes do Fator de Necrose Tumoral e da E-caderina por meio da técnica da PCR em Tempo Real, correlacionando-os com a presença do *H. pylori* e seus marcadores de patogenicidade. Foram analisadas 161 amostras de biópsias provenientes de 137 pacientes de ambos os sexos (62♂/75♀ média de idade de 40,3±24,2) com gastrite crônica e câncer gástrico. Foi observado um aumento estatisticamente significativo da expressão do gene TNF- α em pacientes com gastrite e uma associação entre a presença da bactéria e o aumento da expressão deste gene. Em relação a E-caderina, verificamos uma diminuição da expressão em pacientes com gastrite crônica e em pacientes com câncer gástrico, porém sem uma correlação direta com a presença do *Helicobacter pylori*. Quanto à presença dos marcadores de patogenicidade do *H. pylori*, nossos resultados sugerem que não há uma associação entre os marcadores de virulência e alterações na expressão dos genes estudados. Em resumo, podemos sugerir que o *H. pylori* atue como um agente causador das doenças gástricas alterando a expressão de genes que podem estar relacionados a etiologia das doenças gástricas, porém a troca de epitélio causada pelo *H. pylori* parece contribuir para o desenvolvimento das doenças gástricas.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*, TNF- alpha, E- caderina, doenças gástricas, marcadores virulência.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a gram-negative bacterium that colonizes the gastric mucosa and is responsible for several gastroduodenal diseases, such as gastritis, ulcers, and gastric tumors. It is known that gastric diseases are influenced by the degree of virulence of the infecting *H. pylori* strain, the host genetic susceptibility and environmental cofactors. This study aimed to analyze the expression of genes of Tumor Necrosis Factor and E-cadherin by the Real-Time PCR and correlated it with the presence of *H. pylori* and your virulence markers. All total, 161 gastric biopsies from 137 patients of both gender (62♂ / 75♀ Mean age 40.3 ± 24.2) with gastritis and gastric cancer were analyzed . The statistical analysis revealed a significant increase in expression of TNF- α gene in patients with gastritis and an association between the presences of bacteria increased expression of this gene. In relation to E-cadherin, we observed a decreased expression in patients with gastritis and gastric cancer patients, but without a direct correlation with the presence of *Helicobacter pylori*. About the presence of markers of pathogenicity of *H. pylori*, our results suggest that no there association among markers of virulence and changes in the expression of the studied genes. In summary, we suggest that *H. pylori* acts as a causative agent of gastric diseases changing gene expression that may be related to the etiology of gastric diseases, but the exchange of epithelium caused by *H. pylori* seems to contribute to the development of gastric diseases too.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Aspectos Gerais do <i>Helicobacter pylori</i> e sua epidemiologia	16
2.2. Diagnóstico e tratamento	19
2.3. Marcadores de patogenicidade.....	21
2.4. Fator de necrose tumoral (TNF) e o <i>Helicobacter pylori</i>	24
2.5. E-caderina e o <i>Helicobacter pylori</i>	26
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Caracterização das amostras	32
4.2. Extração de DNA, Detecção e Genotipagem do <i>Helicobacter pylori</i>	33
4.3. Extração de RNA e síntese do cDNA.....	33
4.4. Análise da expressão gênica	34
4.5. Análises estatísticas	34
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	36
5.1. Detecção e genotipagem do <i>H. pylori</i>	36
5.2. Detecção dos alelos/genótipos do TNF- α (-308 G>A).....	37
5.3. Expressão da E-caderina em pacientes com Gastrite e Câncer Gástrico	39
5.4. Correlação entre os marcadores de virulência e a expressão da E-caderina.....	41
5.5. Expressão do TNF- α em pacientes com Gastrite e Câncer Gástrico	41
5.6. Correlação entre os marcadores de virulência e a expressão do TNF- α	43
CONCLUSÕES.....	44
6. CONCLUSÕES.....	45
7. Participação de Eventos Científicos e Artigos Publicados e Enviados	46
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	57
Anexo 2 – Artigo Publicado 1.....	58
Anexo 3 – Artigo Submetido a publicação no periódico: Gastroenterology Research and Practice.....	59

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi descrito por Warren e Marshall em (1983), que isolaram o microorganismo da mucosa de estômagos humanos e foram os primeiros a cultivá-lo *in vitro*, afirmando o envolvimento desta bactéria com o desenvolvimento de úlceras gástricas e gastrites.

Refere-se a uma bactéria microaerofílica, helicoidal, flagelada, gram-negativa, homogênea, espiralada, móvel, não-esporuladae portadora de dois a seis flagelos(Linda Morris Brown(2000); Pacifico et al(2010).Infecta a mucosa estomacal e, através da produção de adesinas, aderi a células epiteliais gástricas, podendo levar a uma inflamação crônica relacionada à várias doenças gastroduodenais (Yamaoka(2008); Suzuki et al (2012).No entanto, indivíduos com infecção por *H.pylori* nem sempre desenvolvem essas doenças, porém apresentam um risco elevado de desenvolver câncer gástrico ao longo da sua vida(NAGINI, 2012; ZEINAB BASIRI et al 2014).

Para colonizar a mucosa gástrica, o *H. pylori* necessita atravessar a barreira de muco e as lípases por ele produzidas, degradam essa camada, permitindo sua rápida penetração, além disso, sua estrutura espiralada em associação com seus flagelos conferem uma ágil movimentação, transpondo rapidamente a camada de muco e instaurando íntimo contato com as células epiteliais (BLASER e COVER 2009).O *H. pylori*é um dos poucos microrganismos capazes de habitar o estômago humano devido a sua capacidade de secretar a enzima uréase, que converte a uréia em amônia, neutralizando parcialmente o ambiente ácido do estômago permitindo sua colonização (GIORDANO et al 2012).

Suzuki e colaboradores (2012) afirmaram que no Brasil, o gênero masculino pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de úlceras pépticas, e sugeriram uma possível relação entre o envelhecimento populacional e o aparecimento de úlceras gástricas, atrofia e metaplasia. O *Helicobacter pylori* infecta aproximadamente 50% da população mundial, porém fatores ambientais e demográficos podem interferir nesses

dados. Na população adulta do Brasil, a infecção por *H. pylori* pode variar de 60% a 90% (SUZUKI et al 2012). No caso de países desenvolvidos a prevalência da infecção varia de 17% a 59% (YAMAOKA, 2008).

A infecção é adquirida por ingestão oral Kivi et al (2007), e é transmitida principalmente entre os familiares na infância (NAHAR et al 2009). Recentemente, nosso grupo de pesquisa Rasmussen et al(2012); Rasmussen et al (2010) publicou resultados que colaboram com os de alguns autores Momtaz et al (2012); Souto et al(2008) os quais sugerem que a cavidade oral possa ser um reservatório da infecção.

A literatura afirma que, os sintomas das doenças gástricas, causados pelo *Helicobacter pylori*, aparecem com mais frequência em adultos, embora a aquisição da bactéria tenha ocorrido no início da vida e que na ausência de tratamento adequado, pode persistir por toda vida, sendo esse, o principal fator etiológico das gastrites e úlceras pépticas (MEGRAUD et al,2007; CHIESA et al, 2010; PACIFICO et al,2010;ZHOU et al, 2013).

A etiologia das doenças gástricas parece ser influenciada pelo ambiente, características genéticas do hospedeiro e da bactéria, assim, a presença ou ausência de determinados genes e suas associações está relacionado com um maior grau de patogenicidade da bactéria *H. pylori*. A literatura destaca três genes como sendo os principais marcadores de patogenicidade; gene *cagA* (Cytotoxin Associated Gene A), o gene *vacA*(Vacuolating Cytotoxin A), e o mais recente gene *dupA* (*Duodenal Ulcer Promoting*) (DEBELLIS et al, 2001; CHIOZZI et al, 2009; CHIURILLO et al, 2013; FAJARDO et al, 2013; SALAMA et al, 2013;ANGELO ZULLO et al, 2014).

Como mencionado anteriormente, fatores genéticos do hospedeiro também podem contribuir para o aparecimento das doenças gástricas, segundo Beales et al (1998) e Crabtree et al (1991) a bactéria *H. pylori* parece induzir a produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), que também é um potente inibidor da secreção de ácido gástrico, tendo

um papel importante no processo infeccioso e por conseqüência, na gastrite induzida pela bactéria.

O TNF- α é uma proteína sintetizada principalmente por macrófagos e monócitos, cuja principal função é promover a resposta imune, através do recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos estimulados por lipopolissacarídeos presentes na membrana das bactérias Gram - negativas (JIN et al, 2012).

A região promotora do gene do TNF- α possui dois polimorfismos de importância clínica, TNF -238 G>A; TNF -308 G>A podendo estar associados com o desenvolvimento de úlceras duodenais, úlceras gástricas e carcinomas gástricos (ZHANG et al, 2014).

Outro gene importante e que parece estar relacionado com o desenvolvimento de gastrite é um subtipo da caderina: E-caderina. A princípio as caderinas têm um papel importante nas interações célula-célula cálcio-dependente e funcionam não somente para estabelecer adesões entre as células, mas também definem especificidade entre as adesões, inibindo a proliferação excessiva e a invasão de tecidos vizinhos (EDELMAN, 1986; HIRANO et al, 1987; GUMBINER, 2000; YAGI et al, 2000,CAVALLARO And CHRISTOFORI, 2001; WHEELLOCK And JOHNSON, 2003; VERED et al, 2012).

Além disso, as caderinas podem interagir direta ou indiretamente com um grande número de vias de sinalização que regulam o comportamento celular (WHEELLOCK And JOHNSON, 2003; TAKEICHI, 2007).

As caderinas são divididas em subtipos distintos de acordo com o local onde são mais abundantemente expressas ou foram originalmente observadas: E-caderina, encontrada inicialmente e de forma mais abundante em epitélios e a N-caderina encontrada primeiramente em tecido neural e fibroblastos (HATTA et al,1987).

Com base nestes dados Terres et al (1998a) e Terres et al (1998b) demonstraram que a infecção pelo *H. pylori* parece induzir a inativação do gene da E-caderina, provavelmente através da sinalização de eventos intracelulares que neutralizam a função da proteína Quinase C, ou através da metilação do gene da E-caderina.

Entre as caderinas, a E-caderina é a mais amplamente estudada em processos neoplásicos, sendo caracterizada como uma molécula supressora de invasão tumoral e metástase (CHRISTOFORI and SEMB, 1999).

A redução da expressão da E-caderina, estudada por métodos imuno-histoquímicos tem sido observada em câncer gástrico e uma correlação direta com o grau de diferenciação tumoral (WIJNHOVEN et al, 2000).

Atualmente sabe-se que a E-caderina não atua somente na adesão celular, mas que também desempenha um papel importante na carcinogênese (CHAN et al, 2006). Além disso, ela é expressa em todos os tipos de células epiteliais, porém foi encontrada com uma menor expressão em várias neoplasias e correlacionada com a capacidade infiltrativa e metastática do tumor (ALBERGARIA et al, 2011).

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos Gerais do *Helicobacter pylori* sua epidemiologia

Do nascimento até a morte, os seres humanos estão em contato com microorganismos, transitórios ou persistentes. Superfícies de mucosa são colonizadas por muitas espécies de bactérias e a distribuição dos micro-organismos não é acidental, cada microambiente é colonizado por micro-organismos que são conservados entre a maioria dos seres humanos ou são parasitas específicos. Sugere-se que cada microbiota conservada apresente uma adaptação específica e, em relação à colonização do estômago humano, a bactéria *Helicobacter pylori* recebe uma especial atenção (BLASER e COVER, 2009).

Em 1982, Warren e Marshall identificaram o *Helicobacter pylori* isolando o microorganismo da mucosa de estômagos humanos, e foram os primeiros a cultivá-lo *in vitro*, afirmando o envolvimento desta bactéria com o desenvolvimento de úlceras gástricas e gastrites. No entanto, indivíduos com infecção por *H. pylori* nem sempre desenvolvem essas doenças, mas apresentam um risco elevado de desenvolver câncer gástrico ao longo da sua vida (NAGINI, 2012).

A bactéria, denominada inicialmente *Campylobacter pylori*, é um bastonete microaerofílico, Gram-negativo em forma de espiral, medindo aproximadamente 0,5 x 3µm. A microscopia de alta potência revela que os organismos têm 2 a 7 flagelos que aumentam a sua mobilidade através de soluções viscosas (Figura1). É encontrada mais comumente nas porções mais profundas do gel mucoso que reveste a mucosa fixando-se no epitélio gástrico, porém em circunstâncias normais não parece invadir as células.

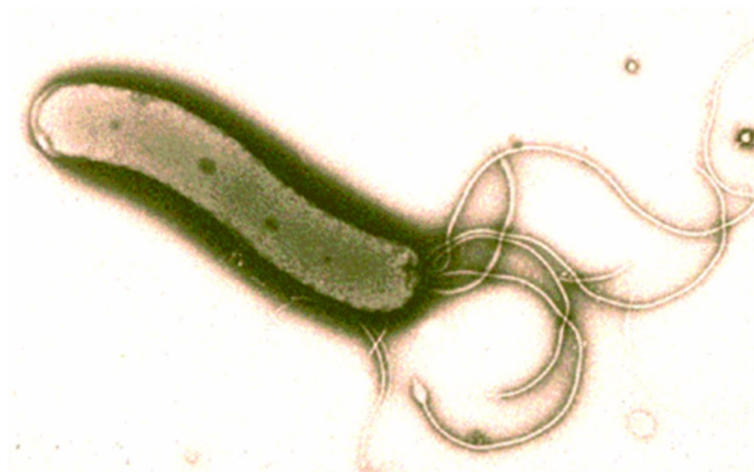


Figura 1: Estrutura do *Helicobacter pylori*

Retirada de: <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2011/02/Helicobacter-pylori.gif>

A sua organização estratégica permite-lhe viver dentro do ambiente agressivo do estômago. Inicialmente o *H. pylori* fixa-se no antro e com o passar do tempo migra para os segmentos mais proximais do estômago. Se não estiverem presentes as condições de crescimento ideais a bactéria adota uma forma cocóide que representa uma adaptação a ambientes hostis, podendo assim sobreviver por longos períodos nas fezes ou na água. (LINDA MORRIS BROWN, 2000; PACIFICO et al, 2010)

A primeira etapa da infecção pelo *H. pylori* depende da motilidade da bactéria e da sua capacidade de produzir urease, a qual produz amônia a partir da ureia, o que constitui uma etapa essencial na alcalinização do pH circulante. Outros fatores bacterianos incluem catalase, lipase, adesinas, fator ativador das plaquetas e pic B (induz as citocinas) que conferem proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, impossibilitando uma resposta eficaz do hospedeiro (GATTI et al, 2006; BLASER e COVER, 2009).

Existem muitas cepas de *H. pylori* que se caracterizam pela capacidade de expressar vários fatores de virulência e é possível que as diferentes doenças relacionadas com a infecção pela bactéria possam ser atribuídas a diferentes cepas do organismo com características patogênicas distintas (KARLSSON et al, 2012).

Suzuki e colaboradores em (2012) afirmaram que no Brasil, o gênero masculino pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de úlceras pépticas, e sugeriram uma possível relação entre o envelhecimento populacional e o aparecimento de úlceras gástricas, atrofia e metaplasia. Os níveis de infecção por esta bactéria variam de acordo com o desenvolvimento do país, estando presente em 25-50% da população nos países desenvolvidos, e em 70-90% da população nos países em desenvolvimento (SABBI, 2011; YAMAOKA, 2008). Estes índices estão associados às condições culturais e de saneamento básico das populações, já que mecanismos de transmissão se caracterizam por ser pelas vias, fecal-oral e oral-oral (SIQUEIRA; LIMA; BARRETO et al, 2007). Na população adulta do Brasil, a infecção por *H. pylori* pode variar de 60% a 90% (SUZUKI et al,2012).

Recentemente Karlsson et al, (2012) afirmam que o desenvolvimento das doenças gástricas é influenciado pelo grau de virulência da cepa *H. pylori* infectante, a susceptibilidade genética do hospedeiro e co-fatores ambientais, sendo de suma importância o entendimento dos marcadores de patogenicidade do *H. pylori* assim como a susceptibilidade genética do hospedeiro.

A maioria dos indivíduos infectados é assintomático, mas cerca de 10-20% podem desenvolver gastrite atrófica, displasia e úlceras péptica, e em torno de 3% o câncer gástrico. Em 1994, a bactéria foi classificada como carcinógeno do tipo I para câncer de estômago pelo *International Agency for Researchon Cancer* (órgão subordinado à Organização Mundial da Saúde) (TAKAISHI; OKUMURA; WANG, 2008). O câncer gástrico é a segunda causa de morte no mundo, com incidência de 800.000 novos casos por ano (SABBI, 2011).

2.2. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* pode ser feito recorrendo a dois tipos principais de exames: os exames não invasivos e os invasivos. (CULTER et al, 1995, HUNT et al, 2010)

Com relação aos não invasivos, estão: o teste respiratório da ureia e a detecção de IgG e IgA, na sorologia. No teste respiratório da ureia o paciente ingere ureia marcada com os isótopos ^{14}C ou ^{13}C . Como a urease degrada a ureia, há formação de amônia e CO_2 . Mensura-se, então, a quantidade de CO_2 exalada pela respiração. Método acessível, com facilidade de execução e muito útil para o seguimento (“follow-up”), após tratamento tanto a sensibilidade como a especificidade são maiores que 90%. (CULTER et al, 1995, HUNT et al, 2010)

Na sorologia a detecção de anticorpos IgG é o mais utilizado, podendo ser utilizado IgA. O material analisado de rotina é o soro, sendo que a saliva também é descrita como fonte de análise. Os métodos mais usados são o ELISA e o radioimunoensaio. É considerado prático, acessível e de fácil execução, muito útil para estudos epidemiológicos. Tem sensibilidade entre 88-99% e especificidade entre 86-95%. (CULTER et al, 1995, HUNT et al, 2010).

Há também testes rápidos de consultório que utilizam as mesmas imunoglobinas, por ELISA ou hemoaglutinação. A grande vantagem é que pode ser realizado com quantidades pequenas de sangue, permitindo seu uso em consultórios médicos. O tempo para o resultado é de 10 minutos. Possui as mesmas características que o anterior, porém com sensibilidade mais baixa que o método sorológico convencional (PATEL et al, 2014).

Por outro lado os exames invasivos incluem: a endoscopia digestiva alta, com coleta de biopsias gástricas, nas quais podem ser realizados: os testes rápidos da urease, a detecção histológica e/ou imunohistoquímica da bactéria, bem como a cultura microbiana e a detecção por biologia molecular. (THOMAS et al, 1997, HUNT et al, 2010).

No Teste rápido da urease, a biópsia é colocado em meio contendo ureia e um indicador colorimétrico de pH. A formação de amônia e o aumento do pH são traduzidos por alteração da cor do meio. O método é rápido e barato, a sensibilidade fica entre 89-98% e especialidade entre 93-98%. (THOMAS et al, 1997, PATEL et al, 2014).

A análise histopatológica é um método com sensibilidade entre 93-99% e especialidade entre 95-99%. (PATEL et al, 2014).

Na cultura o espécime da biópsia é inoculado em placas de ágar em microaerofília por 3-5 dias. O método tem sensibilidade entre 77-92 % e especialidade de 100%. (PATEL et al, 2014).

Na detecção por biologia molecular realiza-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a ampliação do DNA bacteriano. É um método com a mais alta sensibilidade (quase 100%) e especialidade de 100%, porém com custos financeiros elevados (PATEL et al, 2014).

Como todos os métodos possuem sensibilidade e especificidade altas e semelhantes, a escolha dependerá da disponibilidade e acessibilidade do teste, devendo-se considerar também o objetivo da sua realização, seja para diagnóstico, epidemiologia ou seguimento. (PATEL et al, 2014).

O tratamento ideal para o *Helicobacter pylori* ainda não foi definido para todos os pacientes. Além disso, as taxas de resistência aos antibióticos variam conforme a região, e os dados de resistência local devem ser usados para orientar o tratamento, quando disponível. A conduta terapêutica sugere a terapia tripla, a terapia sequencial e terapia quádrupla, conforme resumido nas diretrizes publicadas pela American College of Gastroenterology and Conference Maastricht. (TESTERMAN & MORRIS, 2014)

A terapia tripla é a mais utilizada no tratamento e infecção por *H. pylori*. É administrado um regime contendo um inibidor de bomba de prótons (IBP) (iansoprazol, omeprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol), e os antibióticos amoxicilina e claritromicina por 10-14 dias. (TESTERMAN & MORRIS, 2014)

A terapia seqüencial começa com amoxicilina mais um IBP para os primeiros cinco dias e termina com a terapia tripla, incluindo um IBP, claritromicina e tinidazol. Os primeiros 5 dias de amoxicilina reduzem a carga bacteriana, favorecem posteriormente a eficácia da claritromicina e ainda previnem a incidência de resistência à mesma, destruindo a membrana bacteriana e aumentando a concentração celular. A taxa de erradicação com esta terapia foi elevada (>90%) nos doentes com doença péptica, dispepsia e crianças. A terapia quádrupla utiliza uma combinação de um inibidor da bomba de prótons (IBP), produto de bismuto, e antibióticos contendo metronidazol, amoxicilina e claritromicina para 10 a 14 dias. (TESTERMAN & MORRIS, 2014).

2.3. Marcadores de patogenicidade

O motivo pela qual apenas a minoria de pacientes infectados pelo *H. pylori* desenvolvem manifestações clínicas associadas às doenças gástricas permanece desconhecido. Variações polimórficas em genes que codificam citocinas pró-inflamatórias têm sido associadas com um aumento do risco de doenças gástricas, assim como a presença de fatores de virulência bacterianos.

Os principais fatores de virulência do *H. pylori* incluem **cagA** (*cytotoxin associated gene A*), **vacA** (*vacuolating cytotoxin*), **babA** (*bloodgroupanti gen-bindingadhesin*), **iceA** (*inducedby contact with epithelium*) e, o mais recentemente descrito, **dupA** (*duodenal ulcerpromoting gene*) (LU et al, 2005; MURAKAMI et al, 2006).

✓ **Gene cagA**

Primeiro gene cepa-específico identificado no *H. pylori*, está associado ao risco de desenvolvimento de câncer gástrico sendo o mais patogênico fator de virulência expresso pelo *Helicobacter pylori*.

Existem dois tipos clínicos de *H. pylori*: as cepas de gene *cagA*-positivo, que são mais virulentas e induzem níveis elevados de expressão das Interleucina 1 β , 8 e do Fator de

Necrose Tumoral e as cepas de gene *cagA*-negativo, clinicamente mais brandas (YOSHIOYAMAOKA, 2012). Segundo Arevalo-Galvis et al, (2012), pacientes infectados por cepas *cagA*⁺ apresentam probabilidade três vezes maior de desenvolver câncer gástrico do que aqueles infectados por cepas *cagA*⁻.

O gene *cagA* é considerado um marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag-PAI*), composta por 31 genes e é encontrada em cerca de 60% das cepas. A ilha *cag-PAI* é um componente do genoma do *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV, responsável por a proteína *cagA* em célula hospedeira, modulando as vias do metabolismo celular, incluindo a expressão de proto-oncogenes (LADEIRA et al, 2003; CONRADI et al, 2012).

A proteína *cagA* atua como antígeno altamente imunogênico e sua estrutura revela uma região 5' altamente conservada, mas uma região 3' com número variável de sequências repetitivas, o que leva à variação do comprimento da proteína. Yamaoka et al, (1998) estudaram a variabilidade da região 3' do gene *cagA* e verificam que 86% de uma das variantes eram provenientes de pacientes com câncer gástrico além disso concluíram que outras diferenças na região 3' podem estar relacionadas a diferentes processos patológicos.

✓ **Gene *vacA***

Outro gene relatado como um fator de virulência refere-se ao gene *vacA*, cuja sua proteína foi isolada a partir do sobrenadante de cultura (ATHERTON, 1998). Esta proteína apresenta-se claramente como um importante fator de virulência de *H. pylori*, estando diretamente relacionada a úlceras péptica, gastrites e câncer gástrico.

Todas as cepas de *Helicobacter pylori* são portadoras do gene *vacA*, o qual codifica uma citotoxina vacuolar que, além de vacuolação, pode induzir a formação de canal de membrana, liberação de citocromo e das mitocôndrias que são os principais mecanismos que causam apoptose. Contudo, o gene *vacA* ainda pode inibir especificamente a ativação das células T e sua proliferação (YOSHIOYAMAOKA, 2012).

O gene *vacA* apresenta duas regiões, denominadas: região *s* e *m*, a região *s* está localizada no final da cadeia 5' e possui dois alelos devido a diferenças na estrutura, sendo *s1* e *s2* na região sinal e *m1* e *m2* na região média. Essa variabilidade genética contribui para variações na atividade vacuolar nas diferentes cepas de *Helicobacter pylori*, sendo as cepas *s1/m1* mais citotóxicas (produzem grande quantidade de toxina), seguida por *s1/m2*, por outro lado, as cepas *s2/m2* apresentam atividade citotóxica reduzida, e as *s2/m1* são raras (CONRADI et al, 2012; AREVALO-GALVIS et al, 2012; DE GUSMAO et al, 2000).

Rassow e colaboradores em (2012) relataram a possível associação entre o gene *vacA* e a perda do potencial de membrana mitocondrial, fragmentação mitocondrial, autofagia, morte celular e câncer gástrico.

✓ **Gene *dupA***

Em 2005, Lu e colaboradores, identificaram e nomearam de *duodenal ulcer promoting gene (dupA)*, o primeiro fator de virulência doença-específico do *H. pylori*, o qual parece estar relacionado com o desenvolvimento de úlceras duodenais.

A função do gene *dupA* é desconhecida, mas de acordo com a Lu et al (2005), há semelhança com oTarg / Trad que são hidrolases essencial para a transferência de DNA em conjugação bacteriana e com o domínio FTSK / SpoIIIE que estão envolvidos na divisão celular e transferência de DNA cromossômico. Além disso, o produto gênico do *dupA* é homólogos da ATPase VirB4 que supostamente está envolvido na captação de DNA durante a transferência do material genético e na transferência de proteínas.

O marcador de virulência, *dupA*, está localizado na região de plasticidade do genoma do *H. pylori* e é composto por dois genes: Jhp0917 e Jhp0918 que formam uma abertura para a leitura contínua da sequência, através da inserção de uma base T ou C após a posição 1385 na região 3' do gene Jhp0917.

Além disso, experimentos usando bactérias sem o gene *dupA* relatam que ele pode estar associado ao aumento da produção de Interleucina 8 pelo epitélio gástrico (HUSSEIN et al, 2012; QUEIROZ et al, 2011; SHIOTA et al, 2012). Jung et al, (2012) sugerem que o

dupA possa ser um componente de um novo cluster de genes homólogos aos *Vir* na região de plasticidade do genoma de *H. pylori* e que pode formar o tipo de sistema de secreção IV semelhante ao *cagA*, que por sua vez induz as células epiteliais gástricas a secretarem IL-8.

Alam et al, (2012) estudando pacientes indianos, sugeriram que a presença do gene *dupA* é um importante fator de risco no desenvolvimento de úlceras duodenais; em um outro estudo, Abadi et al, (2012) concluíram que cepas portadoras do gene *dupA* são mais resistentes a acidez estomacal, o que explicaria, em partes, a associação do *H. pylori dupA* positivo com o desenvolvimento das úlceras.

A presença do gene *dupA* no Brasil é pouco estudada e sua associação com outras doenças gástricas ainda é incerta.

2.4. Fator de necrose tumoral (TNF) e o *Helicobacterpylori*

As citocinas são moléculas de peptídeos que medeiam a interação entre as células do sistema imune com outros sistemas, entre eles o sistema endócrino. As mesmas são produzidas por uma variedade de células e seus efeitos biológicos se dão através da ligação em receptores específicos. São liberadas em decorrência de diferentes estímulos e interagem com os seus receptores regulando a função celular (EL-OMAR et al, 2001).

O principal fator fisiopatológico da infecção pelo *H. pylori* é caracterizado pela intensa resposta inflamatória na mucosa gástrica. A quimiotaxia proporcionada pela infecção bacteriana atrai neutrófilos e células mononucleares, que por sua vez estimulam a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias, que atuam mediando a interação entre as células do sistema imune com outros sistemas, entre elas as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e o Fator de Necrose Tumoral (SUGIMOTO et al, 2010;UBERTI et al,2013). Assim, o aumento da produção de citocinas inflamatórias em resposta a infecção por *H. pylori* resulta na intensa inflamação gástrica podendo causar danos à mucosa.

O Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) é uma proteína com peso molecular de 17 kD e composta por 157 aminoácidos, é sintetizado principalmente por macrófagos e monócitos, onde o principal estímulo para a sua produção são os lipopolissacarídeos que

compõem a membrana das bactérias Gram-negativas (JIN et al, 2012). O TNF- α foi descoberto em (1975) por Carswell et al., sendo considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo. A bactéria *H. pylori* induz a produção de TNF- α , que é um potente inibidor da secreção de ácido gástrico, tendo um papel importante no processo infeccioso e por consequência, na gastrite induzida pela bactéria.

A principal função do TNF- α é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Beales et al, (1998) e Crabtree et al, (1991) destacaram que o TNF- α inibi a secreção de ácido gástrico podendo afetar a infecção pelo *H. pylori*; estes autores ainda sugerem que a secreção de ácido gástrico é um dos mais importantes fatores no desenvolvimento de doenças gastroduodenais associadas à infecção por *H. pylori*.

A região promotora do gene do TNF- α contém dois polimorfismos (TNF -238 G>A; TNF -308 G>A) que parecem ser relevantes na susceptibilidade da doença e afetar a atividade transicional dos genes. Desta forma, influencia o processo inflamatório na resposta a doenças infecciosas, podendo estar associados ao desenvolvimento de úlceras duodenais, úlceras gástricas e carcinomas. Kunstmann et al, (1999) foi o primeiro a descrever a associação entre o polimorfismo TNF- α -308 (genótipo GG) com a susceptibilidade a úlceras duodenais em pacientes infectados pelo *H. pylori*.

Santos et al, (2012), estudaram 202 paciente e não verificaram associação entre o polimorfismo TNF- α -308 com câncer gástrico, por outro lado Suganuma et al, (2012) sugerem que o TNF- α induza a expressão da proteína Tip- α que é carcinogênica e é um risco para o desenvolvimento de neoplasia gástrica.

A diversidade de resultados encontrados na literatura pode estar relacionada principalmente a diversidade populacional estudada, e ferramentas utilizadas no diagnóstico do *H. pylori* e genotipagem do TNF- α . No Brasil essa associação permanece incerta, porém

é relevante seu entendimento podendo nos auxiliar no esclarecimento da patogênese da doença gástrica.

2.5. E-caderina e o *Helicobacter pylori*

As caderinas representam uma classe de moléculas de adesão transmembranosas encontradas Berx E Van Roy,(2001); Knudsen E Wheelock, (2005), comumente na forma de dímeros cálcio dependentes (LODISH et al, 2000; MATOS et al, 2006). Associando-se a um grupo de proteínas intracelulares chamadas cateninas, as quais as ligam a microfilamentos actínicos do citoesqueleto e mediam mecanismos transdutores de sinais que regulam o crescimento celular e sua diferenciação. Existem três tipos de cateninas: β , α e γ (OZAWA E KEMLER, 1998). (Figura 2).

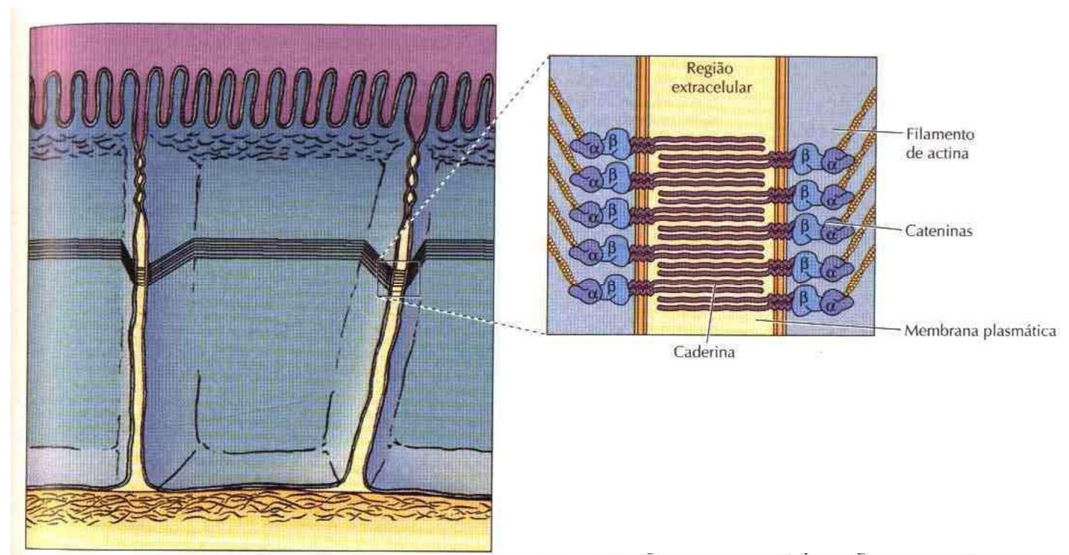


Figura 2: Adesão dos filamentos de actina às junções de adesão

Retirada de <http://biomcelular.blogspot.com.br/2010/06/membrana-plasmatica-membrana-celular.html>

A função da caderina é promover adesão intracelular através interação dos domínios extracelulares típicos deste grupo, com aqueles de moléculas idênticas presentes em células vizinhas (TAKEICHI, 1988). O conjunto de adesões deste tipo entre membranas vizinhas estabelece o que é genericamente chamado de junção aderente. Esta interação em

princípio é hemofílica, de modo que, preferencialmente, células que expressam o mesmo subtipo de caderina mantêm adesões entre si (TAKEICHI, 1995).

As caderinas são moléculas que promovem a manutenção da arquitetura tecidual normal Matos et al(2006) e existem mais de 40 tipos Lodish et al(2000). As mais estudadas são as caderinas: E (epitelial), P (placentária) e N (neural), conhecidas como caderinas clássicas (ROWLANDS et al, 2000).

A E.caderina (caderina epitelial) é um membro da família das caderinas, expressa especialmente por queratinócitos e conhecida por desempenhar um papel importante na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais. É considerado o principal componente na junção de aderência transmembranosa de células epiteliais de todos os órgãos, localizada na superfície lateral das células epiteliais em uma região de contato célula-célula. (TAKEICHI,1991; BAGUTTI et al, 1998; GUILFORD et al, 1999).

Regulação da adesão intercelular mediada pela E-caderina tem sido associada com diferenciação de tumor, invasão, metástase e prognóstico em humanos (ZHONG et al., 2007; KAWANO et al, 2004). Visto que 90% dos cânceres se originam do tecido epitelial Christofori(2006), a progressão da metástase é acompanhada pela perda da expressão da E-caderina (NITA-LAZAR et al, 2009; KUDO et al, 2004).

Por exemplo, a adesão célula-receptor E-caderina é muitas vezes perdida durante estágios avançados de progressão do câncer epitelial Birchmeier & Behrens et al(1994) e este é considerado um passo importante na invasão e metástase das células epiteliais tumorais (CAVALLARO &CRISTOFORI, 2004). Por isso, o papel destas proteínas na invasão e metástase neoplásica tem atraído grande interesse devido à sua promessa como um possível marcador de prognóstico (LOPESet al, 2009).

A mudança morfológica mais aparente que ocorre durante a transição de um tumor benigno para um maligno e metastático é que as células perdem seu fenótipo altamente diferenciado, mudando da morfologia epitelial para a migratória e invasiva. As células tumorais metastáticas se tornam permeáveis à barreira da lâmina basal e invadem os

tecidos a sua volta (HUBER et al, 2005). A expressão da E-caderina tem grande importância para contribuir no diagnóstico e avaliação do prognóstico dessas lesões e também para uma melhor compreensão do comportamento biológico das mesmas.

A redução da expressão da E-caderina, estudada por métodos imunohistoquímicos, tem sido observada em câncer gástrico por vários autores e uma correlação direta com o grau de diferenciação tumoral tem sido observada Wijnhoven et al (2000), além disso, Crabtree et al (1991) encontraram uma relação com o tempo de sobrevivência e a expressão desse gene.

Terres et al (1998a) e Terres et al (1998b) demonstraram que a infecção pelo *H. pylori* parece induzir a inativação do gene da E-caderina, provavelmente através da sinalização de eventos intracelulares que neutralizam a função da proteína Cinesina C, ou através da metilação do gene da E-caderina. Assim, a diminuição da adesão celular, resultante da inativação da E-caderina permite com que o *H. pylori* atinja a lâmina própria gástrica, ative o sistema imune e cause danos teciduais relevantes, induzindo a formação do câncer gástrico e/ou permitindo o aparecimento de metástases.

Huang et al (2012) sugeriram que o *H. pylori* possa induzir a metilação no gene da E-caderina através da Interleucina 1 β sendo um possível fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico.

O *Helicobacter pylori* parece estar diretamente ligado à inativação do gene da E-caderina, e pode representar um risco no desenvolvimento do câncer gástrico. A análise da expressão do gene da E-caderina, avaliada por PCR em tempo real, é pouco descrita na literatura e não há relatos de estudos envolvendo doenças gástricas, *H. pylori* e a análise da expressão da E-caderina, o que torna muito interessante e inovador essa abordagem.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Considerando amostras de biopsia gástrica coletadas de pacientes com sintomas pépticos e neoplasia gástrica, o presente trabalho, teve como objetivos:

- Analisar a expressão gênica (mRNA) dos genes do TNF- α e da E-caderina por meio da técnica de PCR em Tempo Real;
- Caracterizar o polimorfismo -308 (G>A) do genes do TNF- α ;
- Correlacionar a presença da bactéria *H. pylori* à expressão dos genes: TNF- α e E-caderina;
- Correlacionar os principais marcadores de patogenicidade do *H. pylori*, genes *cagA*, *vacA* e *dupA* com alterações na expressão dos genes acima mencionados;
- Correlacionar o polimorfismo -308 (G>A) com alterações na expressão do gene TNF- α

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização das amostras

Foram avaliadas 161 amostras de DNA e RNA, provenientes de 137 pacientes (tecido gástrico normal (n=40), gastrite (n=70), o tecido neoplásico (n =24) e o tecido normal proveniente de pacientes com neoplasia, Margem não neoplasica (n =27)), de ambos os sexos (62♂/75♀ média de idade de 40,3±24,2) com doenças gástricas submetidos à endoscopia digestiva alta e/ou cirurgia gástrica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA ou no Hospital São Paulo (Universidade Federal de São Paulo).

É importante notar que foram coletadas duas amostras de cada paciente com câncer gástrico, uma do tecido neoplásico e a segunda do tecido não neoplásico.

A análise histopatológica foi realizada: todas as amostras foram fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina e Giemsa para exame histológico de rotina. Os parâmetros histológicos foram classificados de acordo com o sistema Sydney.

As biópsias foram histologicamente diagnosticadas com tecido gástrico normal (n=40), gastrite (n=70), o tecido neoplásico (n =24) e o tecido normal proveniente de pacientes com neoplasia (Margem não neoplasica) (n =27) (Tabela 1).

Tabela 1: Total de amostras de cada grupo de indivíduos.

Pacientes (n)	Amostras (n)	
	DNA	RNA
Pacientes com o Tecido Normal Gástrico (40)	40	40
Pacientes com Gastrite (70)	70	70
Pacientes com Neoplasia Gástrica (27)	Tecido Neoplásico (24)	24
	Tecido não neoplásico (27)	27
Total (161)	161	161

Nenhum dos pacientes tinha histórico de exposição à quimioterapia ou radioterapia antes da cirurgia, e não houve outra ocorrência de câncer diagnosticada. Os pacientes submetidos ao tratamento utilizando a terapia antimicrobiana, o uso de AINEs e/ou inibidores da bomba de prótons nos últimos três meses, foram excluídos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Sagrado Coração (processo n. 068/12), (Bauru, Brasil) e o consentimento informado foi obtido de todos os pacientes.

4.2. Extração de DNA, Detecção e Genotipagem do *Helicobacter pylori*

A partir das biópsias gástricas o DNA foi extraído utilizando o kit QIAamp® (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

A detecção e genotipagem do *Helicobacter pylori* foi detectada por meio da PCR. Foram utilizados um par de oligonucleotídeos (Hpx1/Hpx2), o qual amplifica um fragmento de 150pb referente a fração 16S do RNA bacteriano, previamente descritos pelos autores Scholter et al (1997) para o diagnóstico.

Para avaliar a presença dos genes *cagA* e *dupA*, foi utilizado o primer secundário de amplificação descrito por Van Doorn et al (1998) e Gomes et al (2008), respectivamente. As regiões "m" e "s" do gene *vacA* foram genotipadas como descrito anteriormente por (VANDOORN et al 1998, ATHERTON et al 1997 e RASMUSSEN et al 2012).

Vale mencionar que o presente trabalho foi realizado em colaboração com a Faculdade de Medicina de Marília, Laboratório de Genética e que a detecção e genotipagem dos genes *cagA* e *vacA* do *H. pylori* foram realizadas previamente.

4.3. Extração de RNA e síntese do cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA e a qualidade foram mensuradas usando o equipamento Espectrofotômetro NanoDrop- 2000 (Nanodrop, EUA), a concentração

ajustada e armazenada a -80°C até à sua utilização, 500 ng de RNA foram utilizados para a síntese de cDNA utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems™, EUA), segundo protocolo estabelecido pelo fabricante. Todos os cDNA foram armazenados a -20°C a utilização.

4.4. Análise da expressão gênica

A análise da expressão do gene da TNF- α e da E-caderina foi realizada no termociclador automático (*ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System*) e o nível de expressão do RNA nas amostras foram calculados utilizando os valores do Ct pela fórmula $2(-\Delta\Delta\text{Ct})$ de acordo com (LIVAK et al, 2001).

É importante destacar que o tecido gástrico normal e negativo para a infecção por *H. pylori* foi utilizado como controle. Todos os valores de Ct foram obtidos por software 2.0 – 7500 e exportados para software Excel (Microsoft, EUA) para cálculo do RQ.

Os genes analisados foram: Genes alvo: E-caderina *CDH1* (Hs02621185_s1), TNF-Alpha (Hs01113623_g1); genes referência: *GUSB* (Hs00187320_m1), *UBC* (Hs00221499_m1), e *TBP* (Hs00187332_m1).

4.5. Análises estatísticas

A análise da expressão dos genes entre os grupos e sua associação com os marcadores de patogenicidade foram avaliadas pelos testes χ^2 e/ou Exato de Fisher e/ou pelo teste de Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Detecção e genotipagem do *H. pylori*

O *Helicobacter pylori* foi detectado em 94 (58,4%) das 161 amostras. Como esperado, em pacientes com tecido gástrico normal o *H. pylori* foi encontrado em menor frequência, apenas três das quarenta amostras foram positivas.

Dos 70 pacientes com gastrite, o *H. pylori* foi detectado em 47. Além disso, em pacientes com câncer gástrico o *H. pylori* foi isolado em 21 das 24 e em 23 das 27 amostras detectado neoplásico e tecido não neoplásico, respectivamente.

Em concordância com a literatura, o *H. pylori* foi associado como desenvolvimento de gastrite e câncer gástrico ($p < 0,001$). No que diz respeito à presença de marcadores de virulência de *H. pylori*, genes *cagA*, *dupA* e *vacA*, todos os resultados são apresentados na Tabela 2.

Verificamos uma associação entre os genes *cagA* e os alelos *s1/m1* do gene *vacA* em amostras de gastrite, neoplasia e tecido adjacente não neoplásico ($p < 0,001$). O gene *dupA* foi associado ao gene *cagA* em pacientes com gastrite ($p < 0,001$). De modo geral, estes resultados mostram o envolvimento de marcadores de virulência com as doenças gástricas.

Tabela 2: Detecção do *Helicobacter pylori* e distribuição dos marcadores de virulências detectados em biopsias gástricas de pacientes dispépticos e com câncer gástrico.

Histologia	N (%)	Hp+	cagA+	dupA+	vacA		
					s1/m1	s2/m2	s1/m2
Tecido Normal	40(24,8)	3(7,5)	1(2,5)	1(2,5)	1(2,5)	2(5)	-----
Gastrite	70(43,5)	47(67,2)	19(27,2)	25(35,7)	19(27,2)	21(30)	7(10)
Tecido neoplásico	24(14,9)	21(87,5)	20(83,4)	15(62,5)	21(87,5)	-----	-----
Tecido não neoplásico	27(16,8)	23(85,2)	22(81,4)	22(81,4)	23(85,2)	-----	-----
Total	161(100)	94(58,4)	62(38,5)	63(39,1)	64(39,7)	23(14,3)	7(4,3)

N: Número total de amostras; **Hp+:** Número de amostras *H. pylori* positivas

Em concordância com nossos resultados, Oliveira et al,(2014), realizaram um estudo na população brasileira e detectaram o *H. pylori* em 55,12% de suas amostras. A prevalência de cepas de *H. pylori cagA*-positivo foi de 29,6. Estes autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas nas características clínicas e demográficas e nos achados endoscópicos e histológicos entre os pacientes infectados por cepas de *H. pylori cagA*-positivo em comparação com os *cagA*-negativo.

Arachchietalem (2007)descreveramamesma associação, mas encontraramapenatrês pacientescomdispepsiafuncionalinfectadoscomcepasdupApositivos, *cagA*positivo, s1/m1. Os resultados deste estudorevelam umaassociaçãoimportantee sugeriruma possível relaçãoentre os principaisfatores de virulência edodesenvolvimentoda doençagástricagrave.

5.2. Detecção dos alelos/genótipos do TNF- α (-308 G>A)

No que diz respeito à distribuição dos alelos, o alelo G foi encontrado em 260 amostras (117 pacientes com gastrite, 70 de pacientes com tecido gástriconormal, 36 de pacientes com tecido neoplásico e 37 de pacientes com tecido não neoplásico). Por outro lado, o alelo A foi verificado em 62 amostas (23 de pacientes com gastrite, 10 de pacientes com tecido gástrico normal, 12 de pacientes com tecido neoplásico e 17 de pacientes com tecido não neoplásico (Tabela 3 e 4).

O alelo G foi encontrado com maior frequência quando comparado ao alelo A, e o genótipo GG foi o mais freqüente em todas as amostras. No entanto, não houve diferença significativa ($p=ns$) na distribuição dos genótipos e/ou alelos em relação às alterações histológicas (gastrite e câncer gástrico) e a presença do *H. pylori*.

Nossos resultados sugerem que o polimorfismo -308 do gene do TNF- α parece não estar envolvido no aumento do risco de desenvolver a doença gástrica ou com presença de *H. pylori*.

Verificamos uma frequência do alelo A de aproximadamente 19,3 %,resultado que corrobora com o disponibilizado “*Global minor allele frequency (MAF)*”, banco de dados

onde consta a menor frequência alélica de uma população, neste banco de dados há o relato de uma frequência de aproximadamente 10-15%.

Santos et al (2012), estudaram 202 paciente brasileiros e Mei et al (2010),e estudaram 437 pacientes chineses e obtiveram resultados similares aos nossos; também não verificaram diferenças significativas na frequência dos genótipos ou alelos do polimorfismo -308 do gene TNF- α entre pacientes com úlcera duodenal e pacientes controle. O mesmo resultado foi observado quando comparado com pacientes infectados e não infectados pelo *H.pylori*.

Em outro estudo envolvendo o polimorfismo -308 do gene TNF- α , em pacientes com câncer de estômago e úlcera duodenal, Rodrigues et al (2009), analisaram 447 pacientes mexicanos, incluindo 228 com gastrite, 98 com metaplasia intestinal, 63 com câncer no estômago, 58 com úlcera duodenal, e 132 indivíduos assintomáticos. A frequência do alelo G foi maior em relação ao alelo A (80,7 % e 19,3 %, respectivamente), como visto em nossos resultados. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os pacientes e os assintomáticos, foi observada uma associação entre o alelo A e pacientes com úlcera duodenal quando comparado a pacientes com gastrite atrófica.

A diversidade de resultados encontrados na literatura pode estar relacionada principalmente a diversidade populacional estudada, ferramentas utilizadas no diagnóstico do *H. pylori* e genotipagem do TNF.

Tabelas 3- Distribuição dos alelos do TNF- α , polimorfismo -308 (G>A), em amostras de pacientes com tecido gástrico normal, gastrite, tecido neoplásico e tecido não neoplásico.

		Alelos		
		A	G	Total
Grupos	Tecido Normal	10 - 12,5%	70 - 87,5%	80 - 100%
	Gastrite	23 - 16,4%	117 - 83,5%	140 - 100%
	Tecido Neoplásico	12 - 25,0%	36 - 75,0%	48 - 100%
	Tecido Não Neoplásico	17 - 38,5%	37 - 68,5%	54 - 100%

Tabelas 4 - Distribuição dos genótipos do TNF- α , polimorfismo -308 (G>A), em amostras de pacientes com tecido gástrico normal, gastrite, tecido neoplásico e tecido não neoplásico.

		Genótipos			
		AA	GG	GA	TOTAL
Grupos	Tecido Normal	3 - 7,5%	32 - 80%	4 - 10%	40 - 100%
	Gastrite	4 - 5,7%	50 - 72,46%	15 - 21,7%	69 - 100%
	Tecido Neoplásico	4 - 16,6%	16 - 66,6%	4 - 16,6%	24 - 100%
	Tecido Não Neoplásico	6 - 22,2%	16 - 59,2%	5 - 18,5%	27 - 100%

5.3. Expressão da E-caderina em pacientes com Gastrite e Câncer Gástrico

Para a análise da expressão gênica, é importante destacar que todos os grupos foram comparados com o grupo de indivíduos que apresentaram o **tecido gástrico normal, negativo para infecção do *H. pylori* (grupo controle; RQ:1,012)**.

Primeiramente foi analisada a expressão da E-caderina em amostras de paciente com gastrite, independentemente da presença do *H. pylori* (RQ:0.932) e houve uma

diminuição estatisticamente significativa na expressão do gene da E-caderina ($p=0,0131$) (Tabela 5).

Posteriormente, o grupo de paciente com gastrite foi dividido quanto a presença do *H. pylori*. Foi observada uma diminuição estatisticamente significativa na expressão da E-caderina em paciente com infecção por *H. pylori* ($p=0,0047$; RQ:0,904), por outro lado, nenhuma diferença foi observada em pacientes *H. pylori* negativos ($p=0,3230$; RQ: 0,990) (Tabela 5).

Observou-se também uma drástica diminuição na expressão do gene da E-caderina nos tecidos neoplásicos positivos para *H. pylori* com um RQ de 0,578 em comparação com o grupo controle (RQ de 1,012) ($p=0,0002$). No entanto, quando o tecido da margem não neoplásico (RQ: 1,002) foi comparado com o grupo controle (RQ: 1,012) nenhuma diferença foi encontrada ($p=0,1642$) (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da expressão da E-caderina entre os grupos estudados

Gene	Análises Histológica		N	RQ Mean \pm DP	P
	Grupo Controle (n=37)	Grupo em Estudo			
E-cad		Gastrite	70	0,932 \pm 0,19	0,0131*
	Tecido Gastrite	Gastrite <i>Hp+</i>	47	0,904 \pm 0,17	0,0047*
	Normal <i>Hp-</i>	Gastrite <i>Hp-</i>	23	0,990 \pm 0,21	0,3230
	(RQ: 1.012 \pm 0.16)	Neoplasico <i>Hp+</i>	21	0,578 \pm 0,56	0,0002*
		Adj. Não neoplasico <i>Hp+</i>	23	1,002 \pm 0,68	0,1642

N: Número de amostras analisadas; RQ: Quantificação Relativa; DP: Desvio Padrão; *: Diferença estatisticamente significativa.

O *H. pylori* parece desempenhar um papel importante na redução da expressão da E-caderina, por outro lado, em pacientes com câncer gástrico, a redução da expressão foi mais evidente, nossos resultados sugerem que o *H. pylori* contribua para a diminuição da expressão da E-caderina e atue como um “gatilho” induzindo alterações teciduais, que conseqüentemente parecem afetar mais diretamente a expressão da E-caderina.

5.4. Correlação entre os marcadores de virulência e a expressão da E-caderina

Em pacientes com gastrite foi possível a análise de correlação entre alterações na expressão do gene da E-caderina e os marcadores de virulência do *H. pylori*, genes *cagA*, *dupA* e *vacA*. Vale destacar que essa análise não foi possível no grupo de pacientes com câncer, uma vez que 95% dos pacientes apresentavam o mesmo genótipo quanto aos marcadores.

Pacientes infectados por cepas s2/m2 (RQ:0,830) tem uma diminuição estatisticamente significativa da expressão do gene E-caderina quando comparado com paciente infectados por cepas s1/m1(RQ:0,9490; p=0,0162).

Resultados similares foram encontrados quando a presença o gene *cagA* considerada. Pacientes portadores de cepas *cagA* positivo apresentaram um RQ de 0,9628 enquanto pacientes infectados por cepas *cagA* negativa apresentaram um RQ de 0,8634 (p=0,0365) Estes resultados sugerem que a presença do gene *cagA* e/ou genótipo de maior virulência do *vacA* não influenciam na diminuição da expressão da E-caderina.

5.5. Expressão do TNF- α em pacientes com Gastrite e Câncer Gástrico

Em relação à expressão do gene do TNF- α , os mesmos parâmetros de análise do gene da E-caderina foram utilizados.Houve um aumento significativo da expressão em pacientes com gastrite (RQ: 2,960) quando comparado ao grupo controle (RQ: 1,072) (p=0,0001), independentemente da presença do *H. pylori*.

Posteriormente o grupo de pacientes com gastrite foi dividido de acordo com a presença do *H. pylori* e verificamos um aumento significativo da expressão no grupo de pacientes com gastrite *H. pylori* positivo (Média de RQ: 3,77 / p=0,0001) em relação ao grupo controle, resultado que não se repetiu quando compramos o grupo controle e pacientes com gastrite *H. pylori* negativo (Média de RQ: 1,297 / p=0,3697) (Tabela 6).

Verificamos também um aumento estatisticamente significativo (p=0,0001) no grupo de pacientes com gastrite *Helicobacter pylori* positivo (Média do RQ: 3,774) quando

comparados com o grupo de pacientes com gastrite *H. pylori* negativo (Média do RQ: 1,297) (Figura 3).

Nossos resultados indicam que a presença do *H. pylori* induz um aumento significativo da expressão do gene TNF- α . Beales et al (1998) e Crabtree et al (1991) destacaram que o TNF inibi a secreção de ácido gástrico podendo afetar a infecção pelo *H. pylori*; estes autores ainda sugerem que a secreção de ácido gástrico é um dos mais importantes fatores no desenvolvimento de doenças gastroduodenais associadas a infecção por *H. pylori*.

As mesmas análises foram realizadas nas amostras de CG e nas amostras da margem não neoplásica, porém não houve diferente estatisticamente significante quando comparamos as amostras de câncer gástrico ($p=0,6332$) ou da margem não neoplásica ($p=0,4563$) com o grupo controle. As amostras de câncer gástrico e da margem não neoplásica, ambas *H. pylori* positivas apresentaram uma média de RQ de 1,163 e 1,106 respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6:Análise da expressão do TNF- α entre os grupos estudados

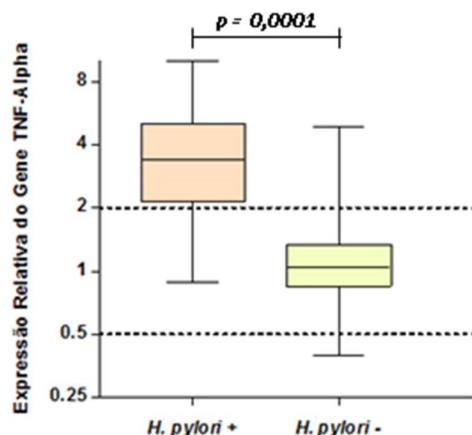
Gene	Análise Histológica		N	Média do RQ \pm DP	P
	Grupo Controle (N=37)	Grupos em Estudo			
TNF- α		Gastrite	70	2,906 \pm 2,06	0,0001*
	Tecido Gástrico	Gastrite <i>Hp+</i>	47	3,774 \pm 1,98	0,0001*
	Normal <i>Hp-</i>	Gastrite <i>Hp-</i>	23	1,297 \pm 0.90	0,3697
	(RQ: 1.072 \pm 0.45)	Câncer gástrico <i>Hp+</i>	21	1,163 \pm 1,08	0,6332
		Margem não Neoplasica <i>Hp+</i>	23	1,106 \pm 0,82	0,4563

Hp: *Helicobacter pylori*; N: Número de amostras analisadas; RQ: Quantificação Relativa; SD: Desvio Padrão; *:Diferença estatisticamente significante $p < 0.05$.

Outra análise se refere ao possível envolvimento do polimorfismo -308 na expressão do gene do TNF- α . Não encontramos associação entre o polimorfismo -308 e alterações na expressão do referido gene, portanto este polimorfismo parece não estar associado a alterações na expressão do TNF- α . Vale mencionar que o número amostral é pequeno para

a análise de polimorfismos e possivelmente esse pequeno número amostral possa ter afetado a análise.

Figura 3: Comparação da expressão relativa do gene TNF- α em pacientes dispépticos *Helicobacter pylori* positivo e negativo



5.6. Correlação entre os marcadores de virulência e a expressão do TNF- α

Não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes portadores de cepas *cagA* positivo e pacientes portadores de cepas *cagA* negativo ($p = 0,4677$). Resultados semelhantes foram encontrados quando comparamos o genótipo s1/m1 do gene *vacA* com o genótipo de menor virulência s2/m2 ($p = 0,3578$).

Pacientes infectados *H. pylori dupA* positivo apresentaram uma média de RQ de 4,04, por outro lado pacientes *dupA* negativo apresentaram uma média de RQ 3,18 porém sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0518$).

Em resumo, nossos resultados sugerem que os principais marcadores de patogenicidade do *Helicobacter pylori*, genes *cagA*, *dupA* e *vacA*, não influenciam na expressão do TNF- α . A presença do *H. pylori* parece desencadear o aumento da expressão do TNF- α , independente dos marcadores de patogenicidade.

Nossos resultados corroboram com os de Zalewska-Ziob e colaboradores (2009) que também relataram alterações na expressão do TNF- α independentemente dos genes *cagA* e *vacA* do *H. pylori*.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- 1) O *H. pylori* parece contribuir para a diminuição da expressão da E-caderina, em tecidos neoplásicos e em pacientes com gastrite positivos para a infecção, quando comparados com o grupo controle. Podemos sugerir que a presença do *H. pylori* resulta na diminuição da expressão da E-caderina, alterando as adesões celulares e conseqüentemente tornando o tecido suscetível a invasão/transformação tumoral. Ao contrário da E-caderina a presença da bactéria induz o aumento significativo da expressão do gene TNF- α em pacientes com gastrite positivo, intensificando a resposta imune e inflamatória, contribuindo para a hipoacidez estomacal e favorecendo o desenvolvimento das doenças gástricas. Apesar dos genes, E-caderina e TNF- α desempenharem papéis distintos e no organismo, a alteração em conjunto de ambos os genes pode representar um marco para o desenvolvimento/evolução das doenças pépticas.
- 2) Os resultados indicam que o polimorfismo do gene TNF- α -308 não está envolvido no aumento do risco de desenvolver a doença gástrica ou com a presença de *H. pylori*
- 3) Segundo nossos resultados, a presença do *Helicobacter pylori* está diretamente relacionada com o aumento da expressão do gene TNF- α em pacientes com gastrite, por outro lado, o *H. pylori* parece influenciar na diminuição da expressão do gene da E-caderina em pacientes com gastrite crônica.
- 4) Os principais marcadores de patogenicidade, genes *cagA*, *dupA* e até mesmo a genótipo de maior virulência do *vacA* parecem não estar envolvidos nas mudanças de expressão dos genes da E-caderina e do TNF- α
- 5) O polimorfismo -308 (G>A) do gene do Fator de Necrose Tumoral não está associado a alterações de expressão do referido gene.

7. Participação de Eventos Científicos e Artigos Publicados e Enviados

Durante o desenvolvimento dos Projetos de Iniciação Científica das alunas Luanna e Mariane, ambas participaram de vários eventos científicos, demonstrando o envolvimento das alunas na área da pesquisa. Abaixo estão destacados os principais eventos científicos relacionados ao presente trabalho:

❖ 60° Congresso Brasileiro de Genética

- 1. Lack of association between TNF-Alpha promotor polymorphism (G-308-A) and gastric disease in patients with H.pylori infection.*
- 2. Association of interleukin 1 beta polimosphism with gastric disease.*
- 3. Detection of virulence markers of Helicobacter pylori, genes dupA, cagA and vacA, in gastric biopsies from dyspeptic patients and gastric cancer.*

❖ 14° Encontro Nacional de Biomedicina

❖ II Jornada da Biomedicina – USC

Outro aspecto importante se refere a participação de ambas as alunas na publicação de dois artigos científicos (Anexos 2 e 3)

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS:

ABADI, A. T.; TAGHVAEI, T.; WOLFRAM, L.; KUSTERS, J. G. Infection with *Helicobacter pylori* strains lacking *dupA* is associated with an increased risk of gastric ulcer and gastric cancer development. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 23-30, 2012.

AKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic. **Regulator.Science**, v. 251, p. 1451-1455, 1991.

ALAM, J.; MAITI, S.; GHOSH, P.; DE, R.; CHOWDHURY, A.; DAS, S.; MACADEN, R.; DEVARBHAVI, H et al. Significant association of *dupA* of *Helicobacter pylori* with duodenal ulcer development in South East Indian population. **J Med Microbiol**, v. 61 p. 1295-302, 2012.

ALBERGARIA, A.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, A. F.; SOUSA, B.; NOBR, E. A. R.; SERUCA, R.; SCHMITT, F.; PAREDES, J. Pcadherin role in normal breast development and cancer. **Int J Dev Biol**, v. 55, p. 811-822, 2011.

ANGELO,Z. et al. Gastric MALT lymphoma: old and new insights. **Annals of Gastroenterology**, p. 27-33, 2014.

ARACHCHI, H. S.; KALRA, V.; LAL, B.; BHATIA, V.; BABA, C.S.; CHAKRAVARTHY, S.; ROHATGI, S.; SARMA, P. M.; MISHRA, V. Das B.; AHUJA, V. Prevalence of duodenal ulcerpromoting gene (*dupA*) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population. **Helicobacter.**, v. 12, n. 6, p. 591–597, 2007.

AREVALO, G. A.; TRESPALACIOS, R. A. A.; OTERO, W.; MERCADO, R. M. M.; POUTOU, P. R. A. Prevalence of *cagA*, *vacA*, *babA2*, and *iceAin H.pylori* strains isolated from Colombian patients with funcional dyspepsia. **Pol J Microbiol**, v. 6, p. 33-40, 2012.

ATHERTON, J. C. et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. **J. Biol. Chem**, v. 270, p. 17771-17777, 1995.

ATHERTON, J. C.; PEEK, R. M.; THAM, Jr., K. T. et al. "Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*", **Gastroenterology**, v. 112, n. 1, p. 92-99, 1997.

BAGUTTI, C.; SPEIGHT, P. M.; WATT, F. M. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Journal of pathology**, v. 186, p. 8-16, 1998.

BEALES, I. L.; CALAM, J. Pathogenic mechanisms in *Helicobacter pylori* infection. **Hosp Med**, v. 59, p. 186-190, 1998.

- BERX, G.; VAN ROY, F. The E.cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast Cancer Research**, v. 3, p. 289-293, 2001.
- BIRCHMEIER, W.; BEHRENS, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. **Biochim Biophys Acta**, v. 1198, p. 11-26, 1994.
- BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 22, p. 283-297, 2000.
- CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 4, p. 118-32, 2004.
- CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. **Biochimica et biofisica Acta**, v.1552, p. 39-45, 2001.
- CHAN, A. O.; HUANG, C.; HUI, W. M.; CHO, C. H.; YUEN, M. F.; LAM, S. K.; RASHID, A.; WONG, B. C. Stability of Ecadherin methylation status in gastric mucosa associated with histology changes. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, p. 831-836, 2006.
- CHIESA, C.; PACIFICO, L.; ANANIA, C.; POGGIOGALLE, E.; CHIARELLI, F.; OSBORN, J. F. *Helicobacter pylori* therapy in children: overview and challenges. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 23, p. 405-416, 2010.
- CHIOZZI, V. et al. Relationship between VacA toxin and ammonia in Helicobacter pylori-induced apoptosis in human gastric epithelial cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v, 60, n. 3, p. 23-30, 2009.
- CHRISTOFORI, G.; SEMB, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressorgene. **TIBS**, v. 24, p. 73-76, 1999.
- CHIURILLO, M. A. et al. Genotyping of Helicobacter pylori virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. **International Society for Infectious Diseases, Barquisimeto**, v. 17, p. 750-756, 2013.
- CHRISTOFORI, G. New signal from the invasive front. **Nature**, v. 44, p. 44-50, 2006.
- CONRADI, J.; TEGTMEYER, N.; WoznaM, Wissbrock M, MichalekC, Gagell M, Cover T FRANK, L.; SEWALD, N.; BACKERT, S. An RGD Helper Sequence in CagL of *Helicobacter pylori* Assists in Interactions with Integrins and Injection of CagA. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 70, 2012.
- COVER, T. L.; BLASER, M. J. Helicobacter pylori in health and disease. **Gastroenterology**, v.136, n.6, p.1863-1873, 2009.

CRABTREE, J. E.; Shallcross, T. M.; HEATLEY, R.V.; WYAT, J. I. Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Gut**, v. 32, p.1473-1477, 1991.

CUTLER, AF. et al. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose Helicobacter

DE GUSMAO, V. R.; NOGUEIRA, M. E.; DE MAGALHAES, Q. D. M.; AGUIAR, R. G.; CAMARGOS, R. A. M.; RAMADAN, A. A. A.; TELES, C. A. S. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 2853-2857, 2000.

DEBELLIS, L. et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin *vacA* increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. **Gastrointest, Liver Physiol**, v. 281, n. 6, p. 1440-1448, 2001.

EDELMAN, G.M. Cell adhesion molecules in neural histogenesis. **Annual Reviews in Physiology**, v. 48, p. 17-30, 1986.

EL-OMAR, E. M.; CHOW, W. H.; RABKIN, C. S. Gastric cancer and *H.pylori*: Host genetics open the way. **Gastroenterology**, v. 121; p. 1002-1004, 2001.

FAJARDO, C.A. et al. *CagA* EPIYA polymorphisms in Colombian *Helicobacter pylori* strains and their influence on disease-associated cellular responses. **World Journal of Gastrointestinal Oncology, Beijing**, v. 5, p. 50-9, 2013.

GATTI, L. L.; MODENA, J. L.; PAYAO, S. L.; SMITH, M. A.; FUKUHARA, Y.; DE OLIVEIRA, R. B.; BROCCHI, M. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Tropica**, v. 100, p. 232-240, 2006.

GIORDANO, A.; CITO, L. Advances in gastric cancer prevention. **World J Clin Oncol**, v. 3, n. 9, p.128–136, 2012.

GOMES, L. I.; G. A. ROCHA, G. A.; ROCHA, A. M. et al. "Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients", **Int J Med Microbiol**, v. 298, n. 3-4, p. 223-230, 2008.

GUILFORD, P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire?. **Molecular medicine today**, v. 5, 1999.

GUMBINER, B. M. Regulation of cadherin adhesive activity. **J Cell Biol**, v. 148, p. 399-404, 2000.

HAN, A. O.; HUANG, C.; HUI, W. M.; CHO, C. H.; YUEN, M. F.; LAM, S. K.; RASHID, A. WONG, B. C. Stability of Ecadherin methylation status in gastric mucosa associated with histology changes. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, p. 831-836, 2006.

HATTA, K.; TAKAGI, S.; FUJISAWA, H.; TAKEICHI, M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. **Developmental Biology**, v.120, p.15-27, 1987.

HIRANO, S.; NOSE, A.; HATTA, K.; KAWAKAMI, A.; TAKEICHI, M. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins) subclass specificities and possible involvement of actin bundles. **Journal of cell biology**, v.105, p.2501-2510, 1987.

HUBER, M.; KRAUT, N.; BEUG, H. Molecular requirements of epithelial mesenchymal transition during tumor progression. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 548-558, 2005.

HUNT, R. H, et al. Helicobacter pylori nos países em desenvolvimento. **WGO Practice Guidelines**. P. 4-14, 2010.

HUSSEIN, N. R.; ABDULLAH, S. M.; SALIH, A. M.; ASSAFI, M. A. *DupA1* Is Associated with Duodenal Ulcer and High Interleukin-8 Secretion from the Gastric Mucosa. **Infect Immun**, v. 80, p. 2971-2972, 2012.

JIN, P.; HU, J.; QIAN, J.; CHEN, L.; XU, X.; MA, F. Identification and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene from *Amphioxus* (*Branchiostomabelcheri*): an insight into the innate immunity of *Amphioxus* and the evolution of LITAF. **FishShellfish Immunol**, v. 32, p. 223-1228, 2012.

JUNG, S. W.; SUGIMOTO, M.; SHIOTA, S.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. The intact *dupA* cluster is a more reliable *Helicobacter pylori* virulence marker than *dupA* alone. **Infect Immun**, v. 80, p. 381-387, 2012.

KARLSSON, A.; RYBERG, A.; NOSOUHI, D. M.; BORCH, K.; MONSTEIN, H. J. Association between *cagA* and *vacA* genotypes and pathogenesis in a *Helicobacter pylori* infected population from Southeastern Sweden. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 129, 2012.

KAWANO, T.; NAKAMURA, Y.; YANOMA, S. et al. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. **Auris Nasus Larynx**, v. 31, p. 35-41, 2004.

KIVI, M.; RODIN, S.; KUPERSHMIT, I.; LUNDIN, A.; TINDBERG, Y.; GRANSTROM, M.; ENGSTRAND, L. *Helicobacter pylori* genome variability in a framework of familial transmission. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 54, 2007.

KNUDSEN, K.A.; WHEELLOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 95, p.488-496, 2005.

KUNSTMANN, E.; EPPLEN, C.; ELITOK, E.; HARDER, M.; SUERBAUM, S.; PEITZ, U.; SCHMIEGEL, W.; EPPLEN, J. T. *Helicobacter pylori* infection and polymorphisms in the tumor necrosis factor region. **Electrophoresis**, v. 20, p.1756-1761, 1999.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method**, v. 25, n.6, 2001.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**, p.1184, 2000.

LOPES, F. F.; MIGUEL, M. C .C.; PEREIRA, A. L. A. et al. Changes in immunoexpression of E-cadherin and β -catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 13, p. 22-29, 2009.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, p.1273-1275, 1983.

MATOS, A.J.F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G.R.; GÄRTNER, F. E.cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico.pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134; p. 182.189, 2006.

MEGRAUD, F.; LEHOURS, P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**. v. 20, p. 280-322, 2007.

MOMTAZ, H.; SOUOD, N.; DABIRI, H.; SARSHAR, M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. **World J Gastroenterol**. v. 18, p. 2105-2111, 2012.

MURAKAMI, K.; KODAMA, M.; FUJIOKA, T. Latest insights into the effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis. **World J Gastroenterol**. V. 12, p. 2713-2720, 2006.

NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J Gastrointest Oncol**. v. 4, p. 156-169, 2012.

NAHAR, S.; KIBRIA, K. M.; HOSSAIN, M. E.; SULTANA, J.; SARKER, S. A.; ENGSTRAND, L.; BARDHAN, P. K.; RAHMAN, M.; et al. Evidence of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by PCR-based RAPD fingerprinting in Bangladesh. **Eur J ClinMicrobiol Infect Dis**. v. 28, p. 767-773, 2009.

NITA-LAZAR, M.; NOONAN, V.; REBUSTINI, I. et al. Over expression of DPAGT1 leads to aberrant N-glycosylation of E-cadherin and cellular discohesion in oral cancer. **Cancer Res**, v. 69, p. 5673-5680, 2009.

OLIVEIRA, J.G.; FERREIRA, C. T.; CAMERIN, A. C. S.; ROTA, C. A.; MEURER, L, SILVEIRA, T. R. Prevalence of infection with *cagA*- positive *helicobacter pylori* strains among children and adolescents in southern Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 5, n. 3, p. 180-185, 2014.

PACIFICO, L.; ANANIA, C.; OSBORN, J. F.; FERRARO, F.; CHIESA, C. Consequences of *Helicobacter pylori* infection in children. **World J Gastroenterol**. v.16 p. 5181-5194, 2010.

PATEL, S. K.; PRATAP, C. B.; JAIN, A. K.; GULATI, A. K.; NATH, G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard?. **World J Gastroenterol**. V. 20, n. 36, p. 12847–12859, 2014.

pylori infection. **Gastroenterology**. v. 109, p. 136-141,1995.

QUEIROZ, D. M. M. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 7, p. 223-230, 2008.

RASMUSSEN, L. T.; DE LABIO, R. W.; NETO, A. C, SILVA, L. C.; QUEIROZ, V. F.; SMITH, M. A. C.; PAYÃO, S. L. M. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies, saliva and dental plaques of dyspeptic patients from Marília, São Paulo, Brazil: presence of *vacA* and *cagA* genes. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**.v. 18, p. 7, 2012.

RASMUSSEN, L. T.; LABIO, R. W.; GATTI, L. L.; SILVA, L. C.; QUEIROZ, V. F.; SMITH, M. A. C.; PAYÃO, S. L. *Helicobacter pylori* detection in gastric biopsies, saliva and dental plaque of Brazilian dyspeptic patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 105, p. 326-330, 2010.

RASSOW, J.; MEINECKE, M. *Helicobacter pylori* *VacA*: a new perspective on an invasive chloride channel. **Microbes Infect**. 2012.

ROWLANDS, T. M.; SYMONDS, J. M.; FAROOKHI, R.; BLASCHUK, O. W. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 53-61, 2000.

SABBI, T. Short review about *Helicobacter pylori* infection in pediatric age: epidemiological and clinical findings, diagnosis, therapy and role of probiotics, **Pediatr Med Chir**, v. 33, p. 221-226, 2011.

SALAMA, N. R. et al. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. **Infect. Immun**. v. 69, p. 730-736, 2001.

SANTOS, J. C.; LADEIRA, M. S.; PEDRAZZOLI, Jr. J.; RIBEIRO, M. L. Relationship of IL-1 and TNF-alpha polymorphisms with *Helicobacter pylori* in gastric diseases in a Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**. 2012.

SCHOLTE, G. H.; VAN DOORN, L. J.; QUINT, W. G. et al. Polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. **Diagn Mol Pathol**, v. 6, n. 4, p. 238-243, 1997.

SHIOTA, S.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. Reply to “*dupA1* is associated with duodenal ulcer and High interleukin-8 secretion from the gastric mucosa”. **Infect immun.** v. 80, p. 2973, 2012.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S. S.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JUINOR, L. J. Aspectos gerais na infecção pelo *Helicobacter pylori*. **Revisão. RBAC.** v. 39, p. 9-13, 2007.

SOUTO, R.; COLOMBO, A. P. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. **J Periodontol.** V. 79, p. 97-103, 2008.

SUGANUMA, M.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K.; TAKAHASHI, A.; FUJIKI, H. Human gastric cancer development with TNF-alpha-inducing protein secreted from *Helicobacter pylori*. **Cancer Lett.** v. 322, p. 133-138, 2012.

SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y.; FURUTA, T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. **World J Gastroenterol.** v. 16, p. 1188-1200, 2010.

SUZUKI, R. B.; COLA, R. F.; COLA, L. T. B.; SPERANÇA, M. A. Different risk factors influence peptic ulcer disease development in a Brazilian population. **World J Gastroenterol.** v. 18, n. 38, p. 5404–5411, 2012.

TAKAISHI, S.; OKUMURA, T.; C. Gastric cancer stem cells. **J. Clin,Oncol.** v. 17, p. 2876-2882, 2008.

TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Current Opinion in Cell Biology.** V.7, p. 619-2, 1995.

TAKEICHI, M. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. **Nature.** V. 8, p. 11-20, 2007.

TAKEICHI, M. The cadherin: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. **Development.** V. 102, p. 639-55,1988.

TERRES, A. M.; PAJARES, J. M.; HOPKINS, A. M.; MURPHY, A.; MORAN, A.; BAIRD, A. W.; KELLEHER, D. *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators. **Infect Immun.** V. 66; p. 2943-2950, 1998a.

TERRES, A. M.; PAJARES, J. M.; O'TOOLE, D.; AHERN, S.; KELLEHER, D. *H. pylori* infection is associated with down regulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell adhesion and proliferation control. **J Clin Pathol.** V. 51, p. 410-412, 1998b.

TESTERMAN, T. L.; MORRIS, J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. **World J Gastroenterol.** V.20, n. 36, p. 12781- 12808, 2014.

THOMAS, E.; CHUANCANG, J. M. D., David, S. C.; CHUANFU, M. D., DONALD, A. F. Jr. The Role of the Oral Cavity in *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical reviews.** v. 92., p. 2148-2154, n. 12, 1997.

UBERTI, A. F.; OLIVERA-SEVERO, D.; WASSERMANN, G. E.; SCOPEL-GUERRA, A.; MORAES, J. A.; BARCELLOS-DE-SOUZA, P.; BARJA-FIDALGO, C.; CARLINI, C. R. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. **Toxicon.** 2013.

VERED, M.; ALLON, I.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. E-cadherin in oral SCC: an analysis of the confusing literature and new insights related to its immunohistochemical expression. **Histol Histopathol.** V. 27, p. 141-150, 2012.

WHEELOCK, M. J.; JOHNSON, K. R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Annual review of cell and developmental biology.** V. 19, p. 207-35, 2003.

WIJNHOFEN, B. P.; DINJENS, W. N.; PIGNATELLI, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. **Br J Surg.** V. 87, p. 992-1005, 2000.

YAGI, T.; TAKEICHI, M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. **Genes Dev.** V. 14, p. 1169-1180, 2000.

YAMAOKA, Y. et al. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori* associated diseases. **J Clin.Microbiol.**v.36, p. 2258-2263, 1998.

YAMAOKA, Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodena lpathogenesis. **J Med Microbiol.** v. 57, p. 545-553, 2008.

ZALEWSKA-ZIOB et al. TNF-alpha expression in gastric mucosa of individuals infected with different virulent *Helicobacter pylori* strains. **Med Sci Monit.** V.15, n 6, p. 166-71, 2009

ZEINAB BASIRI et al. *Helicobacter pylori vacA* d1 Genotype Predicts Risk of Gastric, 2014.

ZHANG, C.; STURGIS, E. M.; ZHENG, H.; ZAFEREO, M. E.; WEI, Q.; LI, G. TNF- α promoter polymorphisms and risk of recurrence in patients with squamous cell carcinomas of the nonoropharynx. **Int J Cancer.** 2014.

ZHONG, L. P.; ZHANG, C. P.; ZHU, H. G. et al. Expression of E-cadherin in cervical lymphnodes from primary oral squamous cell carcinoma patients. **Archives Oral Biology**. v. 52, p. 740-747, 2007.

ZHOU, D. et al. Infections of *Helicobacter spp.* in the biliary system are associated with biliary tract cancer: a meta-analysis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. v. 25, n. 4, p. 447-54, 2013.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PRPPG
Pró-Reitoria
de Pesquisa e
Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Baseado em parecer competente este Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto “**CARACTERIZAÇÃO DO MARCADOR DE PATOGENICIDADE DUPLA, DO HELICOBACTER PYLORI, GENOTIPAGEM E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DO FATOR DE NECROSE TUMORAL E E-CADERINA EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS E ADULTOS COM SINTOMAS PÉPTICOS**”, sob o protocolo nº 068/12, tendo como responsável o pesquisador LUCAS TREVIZANI RASMUSSEN e o considerou *Aprovado*.

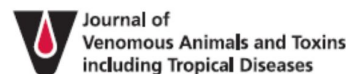
Bauru, 28 de novembro de 2012.



Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan
Presidente Comitê de Ética em Pesquisa – USC

Anexo 2 – Artigo Publicado 1

Pereira et al. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2014, **20**:1
<http://www.jvat.org/content/20/1/1>



RESEARCH

Open Access

Association among *H. pylori* virulence markers *dupA*, *cagA* and *vacA* in Brazilian patients

Weendelly Nayara Pereira¹, Mariane Avante Ferraz¹, Luanna Munhoz Zabaglia¹, Roger William de Labio², Wilson Aparecido Orcini¹, João Paulo Bianchi Ximenez¹, Agostinho Caleman Neto², Spencer Luiz Marques Payão^{1,2} and Lucas Trevizani Rasmussen^{1*}

Abstract

Background: Only a few *Helicobacter pylori*-infected individuals develop severe gastric diseases and virulence factors of *H. pylori* appear to be involved in such clinical outcomes. Duodenal ulcer promoting gene A (*dupA*) is a novel virulence factor of *Helicobacter pylori* that is associated with duodenal ulcer development and reduced risk for gastric carcinoma in some populations. The aims of the present study were to determine the presence of *dupA* gene and evaluate the association among *dupA* and other virulence factors including *cagA* and *vacA* in Brazilian patients. Gastric biopsies were obtained from 205 dyspeptic patients (100 children and 105 adults). DNA was extracted and analyzed for the presence of *H. pylori* and its virulence factors using the polymerase chain reaction method.

Results: Patients with gastritis tested positive for *H. pylori* more frequently. The *dupA* gene was detected in 41.5% of them (85/205); *cagA* gene was found in 98 isolates (47.8%) and *vacA* genotype s1/m1 in 50.2%, s1/m2 in 8.3%, s2/m2 in 36.6%, s2/m1 in 0.5% and s1/s2/m1/m2 in 4.4%. We also verified a significant association between *cagA* and *dupA* genes [$p = 0.0003$, relative risk (RR) 1.73 and confidence interval (CI) = 1.3–2.3]. The genotypes s1/m1 were also associated with *dupA* gene ($p = 0.0001$, RR: 1.72 and CI: 1.3–2.2). The same associations were found when analyzing pediatric and adult groups of patients individually.

Conclusion: Ours results suggest that *dupA* is highly frequent in Brazilian patients and is associated with *cagA* gene and *vacA* s1/m1 genotype, and it may be considered an important virulence factor in the development of gastric diseases in adults or children.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *dupA*, *cagA*, *vacA*, Gastroduodenal diseases, PCR

Anexo 3 – Artigo Submetido a publicação no periódico: Gastroenterology Research and Practice.

Downregulated Expression of E-Cadherin and TP53 in Patients with Gastric Diseases: The involvement of *H. pylori* infection and its virulence markers

Mariane A. Ferraz¹, Luanna M. Zabaglia¹, Weendelly N. Pereira¹, Wilson Aparecido Orcini¹, Roger W. de Labio², Agostinho C. Neto², Fernanda Wisnieski³, Danielle Q. Calcagno³, Leonardo C. dos Santos³, Paulo Pimentel Assumpção⁴, Rommel R. Burbano⁴, Ricardo Artigiani³, Marília de A.C. Smith³, Spencer L. M. Payão¹, Lucas T. Rasmussen^{1,*}

¹ Universidade Sagrado Coração, USC, Bauru, São Paulo, Brazil

² Faculdade de Medicina de Marília, São Paulo, Brazil.

³ Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴ Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém, Pará, Brazil

Abstract

Gastritis caused by infection with *Helicobacter pylori* is characterized by chronic inflammation and damage in gastric tissue, which is a main risk factor for gastric cancer. Associated with *H. pylori*, the TP53 gene tumor suppressor and the cell adhesion glycoprotein epithelial cadherin develop a relevant role in the integrity and carcinogenesis of the epithelium. In the present study, we carried out the detection of *H. pylori* and its main virulence markers and measured the mRNA expression levels of *E-cadherin* and *TP53* genes in 161 samples of gastric biopsies including 37 with normal gastric tissue, 70 with gastritis, 24 from neoplastic tissue and 27 from adjacent nonneoplastic by means of a quantitative real-time polymerase chain reaction. The mRNA expression levels of *E-cadherin* and *TP53* were found to be decreased in patients with gastritis, independently of *H. pylori* infection. In samples from gastric patients, the neoplastic tissue showed an accentuated decrease of expression, on the other hand, the expression of E-cadherin was normal in adjacent nonneoplastic. In addition, no evidence was found of the involvement of the *cagA* and *vacA* genes in the decreased expression of E-cadherin and TP53. The process of carcinogenesis is complex and the decrease of the E-cadherin gene expression and TP53 gene expression appears to contribute significantly.

Keywords: E-cadherin. Gastric cancer. Gene expression. *Helicobacter pylori*. TP53.